



MECANISMOS MOLECULARES QUE DETERMINAN EL ROL PRO AMILOIDOGÉNICO DE LA APOLIPOPROTEÍNA A-I

Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Médicas

CONICET



Rosú, S.A.^{a,b}; Gaddi, G.A.^{a,b}; Ramella, N.A.^{a,b}; Finarelli, G.S.^a; Gisonno, R.^a; Schinella, G.R.^b; Prieto, E.D.^c; Tricerri, M.A.^{a,c}.

^aInstituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP), CONICET. ^bFacultad de Ciencias Médicas, UNLP- CONICET, Calles 60 y 120, La Plata 1900, Buenos Aires. ^cInstituto de Investigaciones Físicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA), UNLP- CONICET aletricerri@yahoo.com

Introducción

Las amiloidosis son patologías crónicas, en las que proteínas mal plegadas inducen citotoxicidad de distinta severidad y en distintos órganos. La amiloidosis inducida por mutantes naturales de la apolipoproteína A-I humana (apoA-I) se presenta con diversas manifestaciones clínicas dependiendo de la variante proteica que se encuentra involucrada¹. En estudios previos determinamos que la conformación proteica puede sufrir alteraciones estructurales inducidas por parámetros pro-inflamatorios del microambiente que favorecen un procesamiento patogénico^{2,3}.

En este trabajo examinamos el efecto de mutaciones puntuales sobre la estructura, estabilidad y tendencia a la agregación de estas proteínas, así como su habilidad para unirse a ligandos del microambiente y de desencadenar respuestas celulares.

Variantes naturales de apoA-I

ApoA-I Variants

associated with amyloidosis

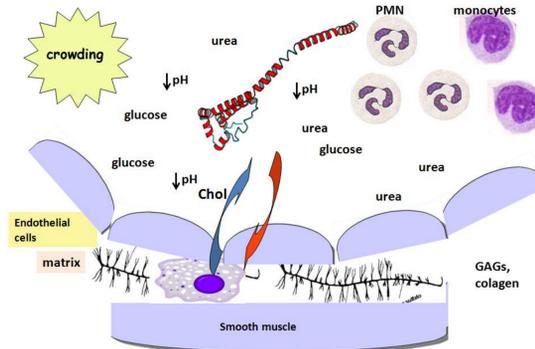
Variant	Organ
WT	Senile
Gly26Arg	Renal failure, peripheral neuropathy
Trp50Arg	Renal failure
Leu60Arg	Renal failure
Leu64Pro	Renal failure
Leu79Pro	Renal failure, hepatic, gastrointestinal
Leu90Pro	Cardiomyopathy, cutaneous amyloid
Lys107del	Aortic intimal amyloid
Ala154fs	Renal amyloid
Leu170Pro	Amyloid in larynx
Arg173Pro	Cardiomyopathy, cutaneous and laryngeal
Leu174Ser	Cardiomyopathy
Ala175Pro	Laryngeal
Leu178His	Cardiomyopathy, cutaneous and laryngeal

not associated with amyloidosis

Glu110Lys

Takada et al *Biochimica et Biophysica Acta*, 1043 (1990) 169

ApoA-I en su microambiente



Estabilidad proteica y plegamiento anómalo

Structural Fluorescence characterization of wt and variants

Protein variants	[GndHCl] ^a _{1/2}	WMF ^b	ΔG° denat ^c (kcal/mol)	K (M ⁻¹) ^d
Wt	1.0 ± 0.2	338 ± 0.2	2.5 ± 0.2	5.3 ± 0.3
Gly26Arg	0.7	340	1.5	7.9
Lys107-0	0.9	340	1.9	6.5
Arg173Pro	0.6	339	NA	6.7
Leu60Arg	0.7	341	NA	8.2
Trp50Arg	0.8	339	2.1	8.5
Glu110Lys (NonA)	1.0		2.7?	

^a which half of the protein is unfolded, respectively ^b Trp Wavelength of maximum fluorescence ^c Free energy change of unfolding ^d Stern-Volmer constant for the quenching of Trp by acrylamide

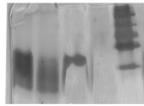
Resultados: todas las variantes analizadas son menos estables que la proteína Wt, lo que puede justificar parcialmente su agregación patológica

Unión a ligandos (heparina como modelo de glicosamino glicano)

Unión de heparina a pH 7.4

Arg173Pro

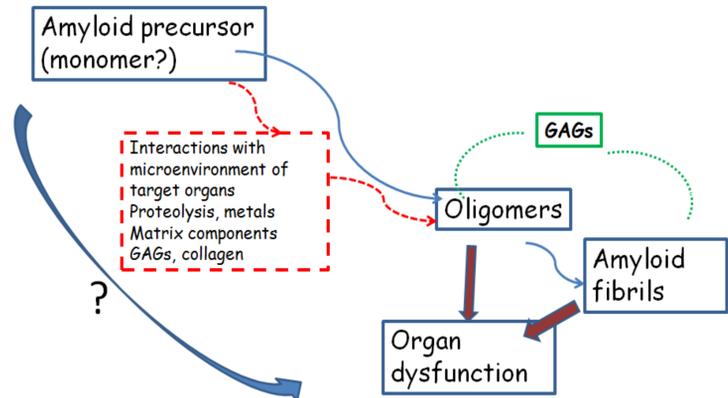
Native-PAGE



Protein binding to heparin was tested following incubation of 0.2 mg/mL proteins with heparin at a 2:1 heparin/protein molar ratio for 48 h at 37°C. The incubation mixtures were analyzed by native PAGE

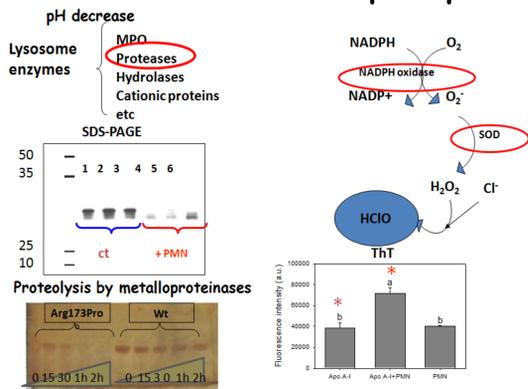
Resultado: el mutante se une a heparina con mayor afinidad a pH fisiológico

Probables vías de señalización involucradas en la amiloidosis inducida por apoA-I



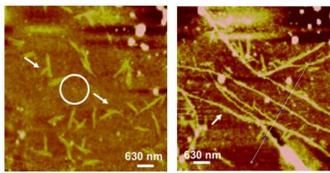
Taken from Merlino et al *J Clin Oncol* (2011) 29:1924-1933

Mecanismos oxidativos involucrados en la amiloidosis inducida por apoA-I



Morfología y caracterización de apoA-I luego de la incubación con HClO

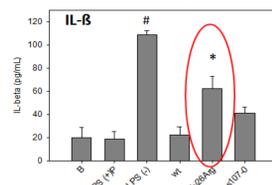
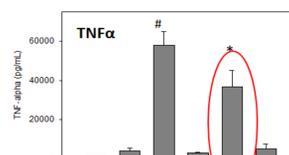
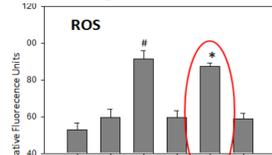
Atomic Force Microscopy



Protein was incubated at 100 mM HClO. ApoA-I (0.6 mg/mL) was incubated for 24 h and 37°C at 100 mM HClO, and loaded stepwise onto the mica.

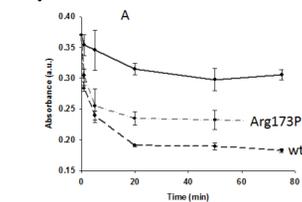
Resultado: oligómeros pequeños cubren la superficie de la mica y estructuras elongadas fibrilares representan la muestra

Efecto de las variantes en la activación de macrófagos



Resultado: el mutante Gly26Arg pero no Lys107-0 induce activación de respuesta pro-inflamatoria, indicando que podría despertar señales celulares locales

Unión de variante Arg173Pro a vesículas lipídicas



Characterization of spontaneous formation of lipid:protein complexes. A) Multilamellar DMPC liposomes were incubated at 24°C and Absorbance measured at 340 nm B) Native 4-24% PAGE analysis of the final product after incubation of wt (lanes 2 and 4) or Arg173Pro (lanes 3 and 5) with DMPC at 24°C for 1 or 2 h, respectively. Lane 1 corresponds to High molecular weight standards 669, 440, 232, 140 and 67 kDa

Resultado: la unión a lípidos está disminuida

Podría la proteína mal plegada inducir respuesta celular que active un proceso inflamatorio crónico?

